

Molekularne marginesy guza nowotworowego

Magdalena Kalinowska-Herok^{1,2}, Małgorzata Roś², Piotr Widłak¹

Zmiany molekularne charakterystyczne dla guza nowotworowego, takie jak mutacje genetyczne czy zmieniony poziom swoistych transkryptów i białek, obserwowane są niekiedy w obrębie prawidłowych morfologicznie i histologicznie tkanek otaczających nowotwór. Taki obszar tkanek otaczających nowotwór nazywany jest marginesem molekularnym guza. Zakłada się, że zmiany molekularne obserwowane w tym obszarze mogą być etapem poprzedzającym zmiany morfologiczne i histologiczne. Skuteczność operacyjnego leczenia nowotworów zależy od całkowitej resekcji guza, a przyczyną niepowodzenia leczenia mogą być wznovy miejscowe, będące efektem pozostawienia poza polem operacyjnym komórek nowotworowych. Nie można jednak wykluczyć, że wznovy miejscowe są efektem transformacji nowotworowej sąsiadujących z guzem tkanek histologicznie prawidłowych, zainicjowanej występującymi tu wcześniej zmianami molekularnymi. W takim ujęciu zdefiniowanie marginesów molekularnych guza i ich usunięcie razem z nowotworem może być kluczowe dla skuteczności leczenia operacyjnego. Istnieje szereg narzędzi diagnostycznych umożliwiających zdefiniowanie obszaru i określenie właściwości molekularnych marginesów guza nowotworowego. Do najczęściej stosowanych należą metody immunohistochemiczne i metody oparte na reakcji PCR, umożliwiające analizę wybranych białek, transkryptów i genów. W ostatnim czasie podejmowane są również próby wykorzystania do badania marginesów molekularnych guza nowotworowego zaawansowanych technicznie metod genomiki i proteomiki. Do najbardziej obiecujących wśród nich należy metoda obrazowania molekularnego tkanek za pomocą spektrometrii mas (*Imaging Mass Spectrometry*).

Tumor molecular margins

Molecular changes characteristic of malignant tumors such as genetic mutations or altered levels of specific transcripts and proteins are sometimes observed within the morphologically and histologically normal tissue adjacent to the tumor. Such an area of morphologically normal yet molecularly changed tissue is called a molecular margin of tumor. It has been suggested that molecular changes observed in this area might be followed by a further transformation into a malignant tumor. The efficacy of surgical treatment of the tumor depends on complete resection of cancer cells, hence local recurrence and failure of the treatment might result from tumor cells residing outside the resected area. However, a local recurrence could also result from malignant transformation of cells in morphologically and histologically normal tissue adjacent to the tumor where molecular cancer-initiating changes were pre-existing. Hence identification and delineation of molecular margins of tumor (and removing them together with the cancer) might be crucial for the efficacy of the treatment. There are several diagnostic tools that can be used for identification and characterization of tumor molecular margins. The most commonly used include immunohistochemistry and PCR-based methods, which allows analysis of pre-selected proteins, transcripts and genes. Most recently, technically advanced methods of genomics and proteomics have been also proposed in studies of molecular margins of cancer, including molecular imaging of tissue by mass spectrometry (so called *Imaging Mass Spectrometry*).

NOWOTWORY Journal of Oncology 2013; 63, 1: 28–34

Słowa kluczowe: margines resekcyjny guza, markery nowotworowe, profil molekularny

Key words: tumor margin, cancer markers, molecular profile

¹Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Gliwicach

²Polsko-Japońska Wyższa Szkoła Technik Komputerowych w Warszawie

Wprowadzenie

Operacja chirurgiczna, zazwyczaj uzupełniona o (neo-) adiuwantową chemio- i/lub radioterapię, jest podstawową metodą leczenia większości typów nowotworów litych. Skuteczność leczenia operacyjnego zależy od całkowitej resekcji guza, a przyczyną jego niepowodzeń mogą być wznowy miejscowe wynikające z pozostawienia poza polem operacyjnym komórek nowotworowych. Tak więc całkowite usunięcie guza jest jednym z kluczowych warunków powodzenia tego typu leczenia onkologicznego. Dla bezpieczeństwa zaleca się usuwanie guza wraz z marginesem tkanki okalającej. Jednak w niektórych przypadkach, np. ze względu na ograniczenia anatomiczne, chirurgiczna resekcja guza może nie być kompletna i agresywna radio/chemioterapia staje się podstawowym narzędziem działania terapeutycznego. Właściwe wytyczenie marginesu resekcji jest kluczowym czynnikiem prognostycznym skuteczności leczenia. Szereg prac wykazuje, że pozostawienie tak zwanych „pozytywnych marginesów” (*tumor-positive margins*) jest oczywistym czynnikiem ryzyka nawrotu miejscowego [1, 2].

Standardową metodą wyznaczenia marginesów guza nowotworowego jest ocena histologiczna, wykorzystująca mikroskopowy obraz morfologiczny tkanki [3]. Stopień kompletności i dokładności resekcji guza nowotworowego jest zwykle oznaczany śródoperacyjnie lub pooperacyjnie za pomocą analizy histopatologicznej na podstawie klasycznego barwienia hematoksyliną i eozyną (HE). Ocena histologiczna preparatów barwionych HE może być w niektórych przypadkach uzupełniona o barwienie immunohistochemiczne, analizujące poziom białka P53 lub innych białek swoistych dla komórek nowotworowych [4, 5]. Obok klasycznych metod analizy histologicznej stosuje się również badania ultrastrukturalne, wykorzystujące transmisyjną mikroskopię elektronową, która umożliwia bardziej precyzyjną ocenę frontu naciekania nowotworu, typu komórek, ich dojrzałości czy indeksu mitotycznego [6]. Jeśli w ocenie patologa zawartość komórek nowotworowych w analizowanej tkance przekracza 70–80%, to materiał taki może być wykorzystany do dalszych analiz genetycznych i molekularnych. Wzmiankowane podejście badawcze, poza analizą marginesów molekularnych, stosowane jest oczywiście również w innych badaniach molekularnych mających na celu między innymi klasyfikację typu nowotworu. Na przykład na podstawie odmiennej ekspresji w tkance nowotworu poszczególnych grup genów rozróżniono dwa różniące się przebiegiem klinicznym podtypy molekularne luminalnego raka piersi, wykazującego ekspresję genów receptora estrogenowego [7].

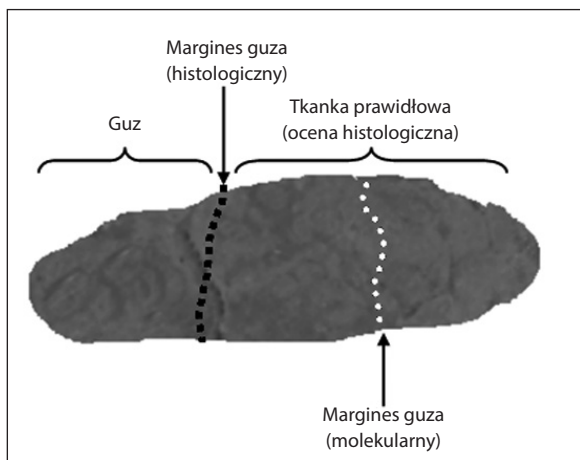
Wymiar marginesu resekcyjnego nie jest czynnikiem uniwersalnym. Praktyka kliniczna zakłada, iż obszar tkanki przyległej do guza, który poddany zostanie resekcji, uzależniony jest od wielu czynników, między innymi: lokalizacji guza, stopnia zajęcia tkanek kluczowych dla funkcji życio-

Tabela 1. Przykładowe wymiary marginesów resekcyjnych stosowanych w różnych typach nowotworów

Typ nowotworu	Wymiar marginesu		Odnosnik literaturowy
Rak jamy ustnej	1 cm		[8]
Rak krtani	0,5 cm		[8]
Rak piersi	0,5–1,0 cm		[9]
	1,0 cm		[10]
Czerniak	guz do	1,0 cm	[11]
	1,0 mm		
	do 2,0 mm	1,0–2,0 cm	
	do 4,0 mm	2,0–3,0 cm	
Rak jelita grubego	powyżej	2,0–3,0 cm	
	4,0 mm		
Rak jelita grubego	g1 i g2	2,0 cm	[12]
	g3	3,0 cm	
Rak wątrobowo-komórkowy	1,0 cm		[13]
Rak żołądka	Lauren (I)	5,0 cm	[13]
	Lauren (II)	7,0 cm	
Rak płuca	1,0 cm		[14]
Rak nerki	0,5–1,0 cm		[15]
Mięsak stawów	1,0–3,0 cm		[16]

wych chorego, współwystępowania zmian przednowotworowych o innej topografii czy też zajęcia węzłów chłonnych. Wszystkie te parametry są również ważnym elementem determinującym podejście do uzupełniającego leczenia adiuwantowego [8]. Przykładowe wymiary marginesów resekcyjnych stosowanych w leczeniu operacyjnym różnego typu nowotworów przedstawione zostały w tabeli 1 [8–16].

Szereg danych wskazuje, że w niektórych przypadkach ryzyko wznowy miejscowej po leczeniu operacyjnym może być bardzo wysokie pomimo stwierdzenia „negatywnych” marginesów histologicznych [17]. Uważa się, że zjawisko to może być przyczyną niskiej, nie przekraczającej 25–30% przeżywalności 5-letniej pacjentów z niektórymi typami nowotworów [18, 19]. Jedną z przyczyn niepowodzeń leczenia pomimo stwierdzenia czystego marginesu histologicznego może być fakt, że ocena histopatologiczna nie zawsze pozwala na wykrycie niewielkich skupisk i pojedynczych komórek nowotworowych. Przypuszcza się również, że wznowy miejscowe mogą być efektem transformacji nowotworowej morfologicznie i histologicznie prawidłowych tkanek sąsiadujących z guzem, zainicjowanej występującymi tu wcześniej zmianami molekularnymi. Zmiany molekularne charakterystyczne dla guza nowotworowego, takie jak mutacje genetyczne czy zmieniony poziom swoistych transkryptów i białek, obserwowane są niekiedy w obrębie prawidłowych morfologicznie i histologicznie tkanek otaczających nowotwór. Taki obszar zmienionych molekularnie tkanek otaczających guz nazywany jest marginesem molekularnym



Rycina 1. Schemat lokalizacji marginesu histologicznego i marginesu molekularnego guza

(rycina 1 schematycznie przedstawia lokalizację marginesu molekularnego). Tak więc określenie marginesów molekularnych i ich usunięcie razem z guzem nowotworowym może być kluczowym elementem skutecznego leczenia operacyjnego. Omówienie informacji dotyczących molekularnych marginesów guza jest przedmiotem niniejszej pracy przeglądowej.

Właściwości molekularnych marginesów guza nowotworowego

Tkanki otaczające nowotwór mogą, pomimo ich prawidłowego obrazu histologicznego, charakteryzować się występowaniem zmian genetycznych lub nietypowym wzorem transkryptów i białek. Obecność takich zmian molekularnych może być oznaką toczącego się procesu transformacji nowotworowej. Stwierdzono, że w tkance mogą istnieć komórki znajdujące się we wczesnej fazie transformacji nowotworowej, które morfologicznie są nie do odróżnienia od komórek genetycznie prawidłowych. Pełna transformacja nowotworowa może w takich przypadkach nastąpić po wielu miesiącach lub latach. Tak więc nawet u pacjentów z marginesem histologicznie określonym jako ujemny istnieje znaczące ryzyko wznowy miejscowej [20]. Z tego powodu określenie w marginesach resekcyjnych obecności markerów molekularnych swoistych dla komórek w stadiach przed- oraz nowotworowych stało się w ostatnich latach istotnym problemem poznawczym i aplikacyjnym. Zagadnienie to jest szczególnie istotne w przypadku raków, gdzie z powodów anatomicznych zastosowanie radykalnych marginesów operacyjnych nie może być praktykowane (np. nowotwory regionu głowy i szyi).

Począwszy od końca lat 90. w literaturze pojawiły się publikacje opisujące propagację do tkanek otaczających nowotwór czynników molekularnych charakterystycznych dla guza. Z powodów metodologicznych (dostępność metod immunohistochemicznych) pierwsze badania koncentrowa-

ły się na białkach i dotyczyły analizy płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi (HNSCC). Badano przede wszystkim białka, które ulegały nadekspresji (np. eIF4) i/ lub mutacji (np. P53) w komórkach nowotworowych [21, 22]. Dla monitorowania kompletności resekcji guza w tkance otaczającej nowotwór analizowano również obecność innych białek charakterystycznych dla guza, m.in.: receptor HER2 w przypadku raka piersi [23], naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna w przypadku raka płuc [24], a także czynnik NF- κ B [25] oraz racemazę α -metylo-koenzymu A [26] w przypadku raka prostaty.

Szereg białek analizowanych jako potencjalne cele terapeutyczne i/lub diagnostyczne jest obecnie badanych również jako charakterystyczne wyznaczniki molekularnych marginesów nowotworu. Przykładem molekuł o potencjalnym znaczeniu dla określenia molekularnych marginesów mięsaków tkanek miękkich są kalcykliny (towarzyszące zmianom nowotworowym np. w raku trzustki) oraz izoformy A i B kalgranulin (badane dotychczas w raku jajnika) [27]. Obie grupy białek mogą wchodzić w interakcje z elementami cytoszkieletu, co prowadzi do dysfunkcji w formowaniu mikrotubul oraz zwiększonej ruchliwości i inwazyjności komórek [28]. Innym przykładem białka charakterystycznego dla marginesu molekularnego mięsaków jest czynnik zahamowania migracji makrofagów (MIF), który w warunkach fizjologicznych krąży w surowicy krwi i jest wydzielany w odpowiedzi immunologicznej przez aktywowane monocyty i makrofagi [27, 29]. Związany jest on z kontrolą proliferacji komórek, różnicowaniem, angiogenezą oraz progresją i przerzutowaniem nowotworów. Do tej pory silną ekspresję MIF przypisywano nowotworom takim jak czerniak [30] i rak piersi [31] oraz przerzutom raka prostaty [32] i gruczolaka płuc [33]. Badania nad cechami marginesów mięsaków tkanek miękkich udowodniły, że MIF stanowi potencjalny czynnik rokowniczy również w tym typie nowotworów [27].

Kolejnymi zmianami molekularnymi analizowanymi w tkance otaczającej nowotwór są charakterystyczne dla guza mutacje genetyczne i zmiany wzoru ekspresji genów. W marginesach molekularnych płaskonabłonkowych raków regionu głowy i szyi, raków jelita grubego i niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) wykrywano między innymi mutacje genów *TP53* i *KRAS* [34–36]. Interesującym aspektem zmian genetycznych związanych z procesem nowotworzenia są mutacje sekwencji mikrosatelitarnych (wielokrotnych tandemowych powtórzeń składających się z krótkich sekwencji dwu-, trzy- lub czteronukleotydo- wych). W przypadku komórek nowotworowych najczęstszymi typami mutacji w obrębie tych sekwencji są utrata jednego allelu (czyli utrata heterozygotyczności; LOH) bądź zmiana liczby powtórzeń [37–39]. Analizę charakterystycznych dla guza zmian sekwencji mikrosatelitarnych wykorzystano do wykrycia komórek transformowanych

Tabela II. Czynniki molekularne identyfikowane w marginesach guzów

Typ nowotworu	Analizowany czynnik	Metoda	Odnosnik literaturowy
HNSCC	<i>elF4E</i>	IHC	[21]
HNSCC	<i>elF4E, TP53, MMP9</i>	IHC	[22]
HNSCC	metylacja <i>MGMT</i> i <i>CDKN2A</i>	PCR	[47]
HNSCC	mutacja <i>TP53</i>	PCR	[34]
HNSCC	ekspresja <i>MMP1, P4HA2, COL4A1</i>	RT-PCR	[41]
HNSCC	ekspresja <i>PTHLH, MET MMP9, EPCAM, LGALS1</i>	RT-PCR	[42]
Rak odbytnicy	mutacje <i>TP53</i>	IHC	[35]
Rak wątrobowokomórkowy	metylacja <i>CDKN2A</i>	PCR	[48]
Rak jelita grubego — przerzuty do wątroby	mutacje <i>KRAS, PIK3CA, APC, TP53</i>	PCR	[49]
NSCLC	mutacje <i>KRAS</i>	PCR	[36]
Rak prostaty	aktywność telomerazy	test aktywności	[50]
Rak piersi	<i>HER2</i>	IHC	[23]

w tkance otaczającej nowotwór i oceny ryzyka niepowodzenia leczenia chorych z nowotworami głowy i szyi [40].

Charakterystyczną dla guza ekspresję szeregu genów obserwowano w tkance otaczającej płaskonabłonkowe raki głowy i szyi [41, 42]. Do wykrycia komórek nowotworowych w marginesie resekcyjnym raków regionu głowy i szyi wykorzystano również detekcję transkryptów ludzkiego antygenu hLy-6D, który ulega ekspresji w 80–90% komórek nabłonka transformowanego nowotworowo [43]. Inny interesujący kierunek analizy cech molekularnych tkanki sąsiadującej z guzami dotyczy zmian epigenetycznych. Zmiany te zachodzą już we wczesnych (przedrakowych) etapach rozwoju nowotworu, a nasilają się wraz z progresją guza i zmianą fenotypu nowotworu w kierunku jego większej agresywności [8]. Istota zmian epigenetycznych polega na modulacji poziomu ekspresji genów poprzez mechanizmy, które nie ingerują w sam zapis informacji genetycznej, lecz modulują sposób jej odczytu. Do czynników epigenetycznych należą metylacja DNA, polegająca na enzymatycznej modyfikacji reszt cytozyny (w procesie metylacji DNA w swoistych sekwencjach pojawiają się reszty 5-metylo-cytozyny), oraz kowalencyjne modyfikacje histonów (przede wszystkim acetylacja, metylacja i fosforylacja), które wpływają na rearanżację struktury chromatyny i dostępność genów dla polimeraz RNA i czynników transkrypcyjnych [39]. W tkance otaczającej raki głowy i szyi stwierdzono hypermetylację promotorów szeregu genów supresorowych (np. genu *CDKN2A* kodującego białko p16) czy genów naprawy (np. genu *MGMT*) [44–46].

Badania dotyczące molekularnej charakterystyki tkanek sąsiadujących z guzem nowotworowym (z których część omówiono wyżej i/lub wymieniono w tabeli II [21–23, 34–36, 41, 42, 47–50]) wykazały, że wiele zmian genetycznych i molekularnych swoistych dla obszaru guza obecnych jest w tkance otaczającej nowotwór określonej jako

histologicznie prawidłowa. Badania te dotyczyły różnych typów czynników molekularnych uczestniczących w różnych procesach komórkowych. Co najbardziej istotne, badania te wykazały, że u pacjentów z negatywnymi marginesami molekularnymi ryzyko wznowy miejscowej jest znacznie niższe niż w przypadku negatywnego marginesu histologicznego i potwierdziły, że marginesy molekularne są istotnym czynnikiem rokowniczym. W tym kontekście ocena marginesów molekularnych nowotworu może stać się kluczowym elementem w planowaniu i przewidywaniu skuteczności leczenia onkologicznego.

Wiedza na temat procesów biologicznych toczących się w histologicznie prawidłowej tkance otaczającej guz nowotworowy jest bardzo ograniczona. Intrygującą wydaje się hipoteza zakładająca, że analizy molekularne mogą identyfikować komórki, które wykazują potencjał nowotworowy — posiadają charakterystyczne zmiany na poziomie molekularnym, ale nie przejawiają oznak fenotypowych odpowiadających strukturze komórek guza. Obecność takich cech molekularnych mogłaby prowadzić do kaskady przemian skutkujących zmianami fenotypowymi, a w kolejnym etapie do kompletnej transformacji nowotworowej. Przypuszcza się, że w nowotworach indukowanych kancerogenami chemicznymi zmiany przednowotworowe występują w całej tkance ekspozowanej na działanie czynników kancerogennych, a taki hipotetyczny proces określa się terminem *field cancerization*. Zakłada się, że tylko niewielka liczba komórek z takiego „obszaru kancerogenezy” ulega kompletnej transformacji nowotworowej i ułożliwieniu, jednak wszystkie te komórki mają podobny wyjściowy potencjał nowotworzenia [51, 52]. Potwierdzeniem takiego modelu nowotworzenia mogą być obserwacje poczynione w rozwoju między innymi raków regionu głowy i szyi. U chorych z tymi nowotworami znaczne fragmenty powierzchni śluzówki górnych dróg oddechowych ekspozowane są

na działanie alkoholu i dymu tytoniowego. Czynniki te są swoistymi czynnikami rakotwórczymi, które indukują liczne zmiany przednowotworowe (dysplazje), jednak jedynie 20–40% takich zmian przednowotworowych rzeczywiście przekształca się w postać nowotworową [53]. Charakterystyka czynników molekularnych swoistych dla marginesu raka i poznanie wzajemnych zależności pomiędzy nowotworem a otaczającą go „prawidłową” tkanką mogą być kluczowe dla wyjaśnienia wielu kwestii związanych z rozwojem i ewolucją zmian przed- i nowotworowych. Samo zjawisko zmian molekularnych pojawiających się w trakcie procesu nowotworzenia przed zmianami morfologicznymi i histologicznymi lub niezależnie od nich jest fascynującym zagadnieniem dotyczącym korelacji między zmianami molekularnymi, funkcjonalnymi i strukturalnymi, kluczowym dla wyjaśnienia wielu aspektów biologii nowotworów.

Nowe perspektywy w badaniach molekularnych marginesów nowotworów

Lokalne wznowy nowotworu występujące pomimo stwierdzenia po operacji chirurgicznej ujemnych marginesów histologicznych są prawdopodobnie związane z obecnością mikroognisk komórek nowotworowych w sąsiedztwie guza, które w konwencjonalnym badaniu histopatologicznym są zaklasyfikowane jako prawidłowy komponent tkanki lub też wynikają z obecności komórek z molekularnymi zmianami przednowotworowymi, które z czasem nabierają kompletnych cech fenotypu nowotworowego. Dlatego też prawidłowa ocena marginesów molekularnych jest istotnym czynnikiem rokowniczym umożliwiającym prognozowanie skuteczności leczenia. Szczegółowe scharakteryzowanie zasięgu i cech marginesów molekularnych guza wymaga wdrożenia całego panelu metod diagnostycznych obejmujących zaawansowane testy molekularne. Większość dotychczasowych prac dotyczących molekularnych marginesów nowotworu posiłkowała się technikami analizy swoistych białek i genów (np. immunohistochemia lub PCR) i koncentrowała się na czynnikach charakterystycznych dla komórek nowotworowych. Podejście takie jest w pełni uzasadnione w badaniach diagnostycznych ukierunkowanych na analizę ustalonych wcześniej biomarkerów. Jednak w przypadku badań o charakterze poznawczym, których celem jest zidentyfikowanie nowych czynników determinujących interakcje między komórkami guza i komórkami tkanki otaczającej nowotwór, coraz większe znaczenie mają techniki genomiki i proteomiki, umożliwiające analizę globalnych profili molekularnych nie ograniczoną do wybranych wcześniej genów i białek.

Do scharakteryzowania i zidentyfikowania czynników obecnych w marginesach molekularnych guza wykorzystuje się technikę obrazowania molekularnego tkanki, tzw. *Imaging Mass Spectrometry* (IMS). Technika ta bazuje na spektrometrii mas MALDI-ToF zastosowanej bezpośrednio do odpowiednio przygotowanych preparatów tkankowych.

Metoda IMS umożliwia detekcję i analizę przestrzennej dystrybucji różnych białek i innych cząsteczek biologicznych, w tym lipidów, leków i metabolitów. Ponadto umożliwia ona też skorelowanie cech molekularnych z morfologicznymi i strukturalnymi właściwościami tkanek. Olbrzymią zaletą tej metody jest możliwość przeprowadzenia globalnej analizy proteomicznej, nieograniczonej do kilku wybranych białek, co stanowi o jej wyższości nad klasycznymi metodami immunohistochemicznymi. Potencjał techniki IMS powoduje, że jest ona obecnie jednym z intensywniej rozwijanych narzędzi proteomiki, o szerokim spektrum zastosowania w badaniach biologicznych i medycznych. Uzyskane w tej metodzie profile białkowe są w stanie nie tylko rozróżnić tkankę zdrową od nowotworowej, ale także ukazują różnice pomiędzy wczesnym i późnym stadium raka. Ponadto technika ta umożliwia klasyfikację różnych klas i podtypów nowotworów na poziomie molekularnym [54].

Metoda MALDI-IMS wykorzystana została po raz pierwszy do scharakteryzowania molekularnego marginesu inwazyjnych mięsaków tkanek miękkich [27]. Autorzy tej pracy wykazali, że chociaż większość białek swoistych dla guza występuje tylko w tkance nowotworowej, szereg białek charakterystycznych dla guza obecnych było również w tkance uznanej za histologicznie prawidłową. Niektóre z takich białek, m.in. kalcyklina, kalgranulina i czynnik MIF, wykrywane były nawet 1,5 cm poza granicą określoną jako histologiczny margines guza. Podobna analiza wykonana dla jasnokomórkowego raka nerki wykazała, że do białek o podobnym wzorze ekspresji w guzie nowotworowym i otaczającej tkance należały składniki mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów [55]. Inna oparta o technikę IMS analiza raka jajnika wykazała, że tkanka znajdująca się na styku guza nowotworowego i tkanek prawidłowych charakteryzuje się odrębnymi cechami molekularnymi, nie występującymi ani w tkance guza, ani w tkance prawidłowej. Do białek charakterystycznych dla takiego styku tkanek należą między innymi plastyna-2 i peroxyredoxyna-1 [56].

Badania proteomiczne wykorzystujące technikę IMS pozwalają na określenie kompletnego profilu molekularnego otoczenia guza i sąsiednich tkanek prawidłowych, a zarazem umożliwiają pełne oszacowanie zasięgu tych zmian poza histologicznie zdefiniowany margines tkanki nowotworowej. Co ciekawe, przeprowadzone badania wykazały, że wśród czynników charakterystycznych dla molekularnych marginesów guza znajdują się również białka nie traktowane dotychczas jako oczywiste czynniki swoiste dla nowotworu i nie analizowane pod kątem ich możliwego udziału w procesie nowotworzenia. Stwarza to więc warunki dla pełniejszego i bardziej precyzyjnego poznania procesów biologicznych toczących się na granicy guza i tkanki prawidłowej, mających istotne znaczenie dla rozwoju nowotworu i interakcji między komórkami nowotworowymi i komórkami otaczających go tkanek.

Podziękowania

Praca była współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach EFS, projekt INTERKADRA (nr UDA-POKL-04.01.01-00-014/10-00) oraz grantu NCN 11/03/D/NZ4/03507.

Dr n. med. Magdalena Kalinowska-Herok

Centrum Onkologii — Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie
Centrum Badań Translacyjnych
i Biologii Molekularnej Nowotworów
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44–101 Gliwice
e-mail: mkalinowska@io.gliwice.pl

Otrzymało: 9 maja 2012 r.

Przyjęto do druku: 11 lipca 2012 r.

Piśmiennictwo

1. Aziz D, Rawlinson E, Narod SA i wsp. The role of reexcision for positive margins in optimizing local disease control after breast-conserving surgery for cancer. *Breast J* 2006; 12: 331–337.
2. van den Ouden D, Bentvelsen FM, Boeve ER i wsp. Positive margins after radical prostatectomy: correlation with local recurrence and distant progression. *Br J Urol* 1993; 72: 489–494.
3. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 2002; 41(3A): 154–161.
4. Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y i wsp. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 196–201.
5. Gao W, Mady HH, Melhem MF i wsp. Analysis of p53 mutations in histologically normal lung tissues and lung tumors from non-small cell lung cancer patients. *Mol Carcinogen* 2009; 48: 633–641.
6. Golusiński W. Prognozowanie w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi na podstawie oceny proliferacji komórek nowotworowych. *Post Chir Głowy i Szyi* 2003; 2: 3–20.
7. Duda-Szymańska J, Sporny S. Praktyczna wartość molekularnej klasyfikacji raków sutka. *Pol Merk Lek* 2011; XXXI 181: 5–8.
8. Szyfter K, Mielcarek-Kuchta D, Kiwerska K. Wartość prognostyczna marginesu operacyjnego w nowotworach głowy i szyi. *Post Chir Głowy i Szyi* 2009; 3: 56–62.
9. Smitten K, Margin status after breast-conserving treatment of breast cancer: How much free margin is enough? *J Surg Oncol* 2008; 98: 585–587.
10. Krekel NM, Zonderhuis BM, Schreurs HW i wsp. Ultrasound-guided breast-sparing surgery to improve cosmetic outcomes and quality of life. A prospective multicentre randomised controlled clinical trial comparing ultrasound-guided surgery to traditional palpation-guided surgery (COBALT trial). *BMC Surg* 2011; 11: 8.
11. Sladden MJ, Balch C, Barzilai DA i wsp. Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2009.
12. Łacko A. Rak jelit grubej. Borgis — *Post Nauk Med* 2011; 2: 137–145.
13. Popiela T, Drews M, Jeziorski A i wsp. Nowotwory żołądka, brodawki Vater, jelita cienkiego, trzustki, wątroby, przewodów żółciowych i pęcherzyka żółciowego. *Onkol Prakt Klin* 2007; 3 (Supl. C): 105–149.
14. Sawabata N, Inoue M, Shiono H i wsp. Malignant margin in wedge resection for peripheral lung cancer and adjuvant radiotherapy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1479–1480.
15. Heinrich E, Egner T, Noe M i wsp. Organ-preserving endoscopic kidney cancer resection. *Eur Urol* 2006; 50: 732–737.
16. Slootweg PJ, Hordijk GJ, Schade Y i wsp. Treatment failure and margin status in head and neck cancer. A critical view on the potential value of molecular pathology. *Oral Oncol* 2002; 38: 500–503.
17. Silverman S Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc* 2001; 132 (Suppl): 75–115.
18. Al-Benna S, Poggemann K, Steinau HU i wsp. Diagnosis and management of primary breast sarcoma. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010; 122: 619–626.
19. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 195–215.
20. Batsakis JG. Surgical excision margins: a pathologist's perspective. *Adv Anat Pathol* 1999; 6: 140–148.
21. Nathan CO, Franklin S, Abreo FW i wsp. Expression of eIF4E during head and neck tumorigenesis: possible role in angiogenesis. *Laryngoscope* 1999; 109: 1253–1258.
22. Nathan CO, Amirghahri N, Rice C i wsp. Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Laryngoscope* 2002; 112: 2129–2140.
23. Miller AR, Brandao G, Prihoda TJ. Positive margins following surgical resection of breast carcinoma: analysis of pathologic correlates. *J Surg Oncol* 2004; 86: 134–140.
24. Merrick DT, Haney J, Petrunich S i wsp. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer* 2005; 48: 31–45.
25. Fradet V, Lessard L, Begin LR i wsp. Nuclear factor-kappaB nuclear localization is predictive of biochemical recurrence in patients with positive margin prostate cancer. *Clin Cancer Res*; 10: 8460–8464.
26. Ananthanarayanan V, Deaton RJ, Yang XJ i wsp. Alphamethylacyl-CoA racemase (AMACR) expression in normal prostatic glands and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN): association with diagnosis of prostate cancer. *Prostate* 2004; 63: 341–346.
27. Caldwell RL, Gonzalez A, Oppenheimer SR i wsp. Molecular assessment of the tumor protein microenvironment using Imaging Mass Spectrometry. *Cancer Genomics&Proteomics* 2006; 3: 279–288.
28. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 637–668.
29. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN i wsp. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995; 377: 68–71.
30. Shimizu T, Abe R, Nakamura H i wsp. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 751–358.
31. Bini L, Magi B, Marzocchi B i wsp. Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis* 1997; 18: 2832–2841.
32. Meyer-Siegler K, Hudson PB. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology* 1996; 48: 448–452.
33. Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J i wsp. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2000; 89: 334–341.
34. Poeta M L, Manola J, Goldenberg D i wsp. The Ligamp TP53 assay for detection of minimal residual disease in head and neck squamous cell carcinoma surgical margins. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 7658–7665.
35. Pan ZZ, Wan DS, Zhang CQ i wsp. Using p53-immunostained large specimens to determine the distal intramural spread margin of rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1626–1629.
36. Masasyeva BG, Tong BC, Brock MV i wsp. Molecular margin analysis predicts local recurrence after sublobar resection of lung cancer. *Int J Cancer* 2005; 113: 1022–1025.
37. Ashazila MJ, Kannan TP, Venkatesh RN i wsp. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in oral squamous cell carcinoma in Malaysian population. *Oral Oncol* 2011; 47: 358–364.
38. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3380–3387.
39. Glazer CA, Chang SS, Ha PK, Califano JA. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. *Oral Oncology* 2009; 45: 440–446.
40. Sardi I, Franchi A, Ferriero G i wsp. Prediction of recurrence by microsatellite analysis in head and neck cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29: 201–206.
41. Reis PP, Waldron L, Perez-Ordóñez B i wsp. A gene signature in histologically normal surgical margins is predictive of oral carcinoma recurrence. *BMC Cancer* 2011; 11: 437.
42. Carvalho AC, Kowalski LP, Campos AH i wsp. Clinical significance of molecular alterations in histologically negative surgical margins of head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 2012; 48: 240–248.
43. Graveland AP, de Maaker M, Braakhuis BJ i wsp. Molecular detection of minimal residual cancer in surgical margins of head and neck cancer patients. *Cell Oncol* 2009; 31: 317–328.
44. Wollenberg B, Walz A, Kolbow K i wsp. Clinical relevance of circulating tumour cells in the bone marrow of patients with SCCN. *Onkologie* 2004; 27: 358–362.

45. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol* 2004; 40: 145–153.
46. Bennett KL, Karpenko M, Lin MT i wsp. Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 4494–4499.
47. Goldenberg D, Harden S, Masayesva BG i wsp. Intraoperative Molecular Margin Analysis in Head and Neck Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 39–44.
48. Yanga B, Gaob YT, Dub Z i wsp. Methylation-based molecular margin analysis in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1353–1358.
49. Holdhoff M, Schmidt K, Diehl F i wsp. Detection of tumor DNA at the margins of colorectal cancer liver metastasis. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 3551–3557.
50. Straub B, Müller M, Krause H i wsp. Molecular staging of surgical margins after radical prostatectomy by detection of telomerase activity. *Prostate* 2001; 49: 140–144.
51. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA i wsp. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell Int* 2007; 15: 7–2.
52. Heaphy CM, Griffith JK, Bisoffi M: Mammary field cancerization: molecular evidence and clinical importance. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 118: 229–239.
53. Mashberg A. Erythroplasia vs. leukoplakia in the diagnosis of early asymptomatic oral squamous carcinoma. *N Engl J Med* 1977; 297: 109–110.
54. Schwamborn K, Caprioli RM. Molecular imaging by mass spectrometry — looking beyond classical histology. *Nature Reviews Cancer* 2010; 10: 639–646
55. Oppenheimer SR, Mi D, Sanders ME i wsp. Molecular analysis of tumor margins by MALDI mass spectrometry in renal carcinoma. *J Proteome Res* 2010; 9: 2182–2190.
56. Kang S, Shim HS, Lee JS i wsp. Molecular proteomics imaging of tumor interfaces by mass spectrometry. *J Proteome Res* 2010; 9: 1157–1164.